

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

**Einfluß von d-Aldosteron, Triamteren und
Amilorid auf die Aktivität mitochondrialer,
hyaloplasmatischer und mikrosomaler Enzyme
in der Rattenniere**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus von Bergmann

aus Berlin

1969

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

**Einfluß von d-Aldosteron, Triamteren und
Amilorid auf die Aktivität mitochondraler,
hyaloplasmatischer und mikrosomaler Enzyme
in der Rattenniere**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus von Bergmann

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Herbert L a x

Referent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Korreferent: Professor Dr. med. Klaus H i e r h o l z e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 28. 10. 1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
<u>Methodik</u>	6
1. Tiermaterial und Vorbereitung der Tiere	6
2. Dosierung und Einwirkungsdauer der verwendeten Hormone und Pharmaka	6
3. Aufarbeitung der Nieren	7
4. Untersuchte Enzyme	7
I. Mitochondrale Fraktion (10 000 g-Sediment)	7
II. Mikrosomale Fraktion (100 000 g-Sediment)	8
III. Hyaloplasmatische Fraktion (100 000 g-Überstand)	8
5. Bestimmungsmethoden der untersuchten Enzyme	8
I. Citrat-Synthase (CS)	8
II. Aconitase	9
III. NADP-Isocitratdehydrogenase (ISDH)	10
IV. Glutamatdehydrogenase (GDH)	11
V. α -Ketoglutaratdehydrogenase (α -KDH)	12
VI. Succinatdehydrogenase (SDH)	12
VII. NADH ₂ -Cytochrom _c -Reduktase	13
VIII. NADPH ₂ -Cytochrom _c -Reduktase	14
IX. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)	15
6. Eiweißbestimmung	15
7. Statistische Auswertung	16
<u>Ergebnisse</u>	17
1. Beeinflussung der Aktivität mitochondrialer Enzyme durch Entfernung der Nebennieren	17
2. Einfluß von Aldosteron auf die Aktivität mitochondrialer Enzyme adrenaletomierter Tiere	17

3. Beeinflussung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität durch Adrenalektomie und Gabe von Aldosteron 19
4. Aktivitätsveränderungen der mikrosomalen NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase nach Entfernung der Nebennieren und Gabe von Aldosteron 21
5. Einfluß von Triamteren und Amilorid auf die Aktivität der mikrosomalen NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase 22
6. Aktivitätsänderungen mitochondrialer Enzyme unter dem Einfluß von Triamteren und Amilorid 23

Diskussion

25

Zusammenfassung

29

Literatur

31

Einleitung

Bei Untersuchungen über den Mechanismus der Natrium-retinieren- den Wirkung des Aldosterons wurden Befunde erhoben, nach denen dieser eine Induktion der Synthese von Enzymproteinen zugrunde liegt (Abb. 1). Hierfür spricht die Beobachtung, daß Aldosteron selbst bei Injektion in die Nierenarterie nicht sofort wirkt, sondern daß zwischen der Gabe bzw. dem Zusatz des Mineralocorti- coids und der Beschleunigung des Na^+ -Transportes eine Latenzzeit

Befunde, die für eine Steigerung der Proteinsynthese
als Ursache der Beschleunigung des Na^+ -Transportes
durch Aldosteron sprechen:

Organ	Befund	Autoren
Harnblase (<i>Bufo marinus</i>)	Latenzzeit (ca. 1 Std) zwischen Zugabe von Aldosteron und der Be- schleunigung des Na^+ -Transportes	CRABBÉ 1963
Harnblase (<i>Bufo marinus</i>)	Bevorzugte Anreicherung von d-Aldosteron- H^3 in den Kernen der epithelialen Mucosazellen	EDELMAN, BOGOROCH u. PORTER 1963
Rattenniere	Beschleunigung der Inco- poration von H^3 -Orotat	FANESTIL u. EDELMAN 1965
Harnblase (<i>Bufo marinus</i>)	bzw. H^3 -Uridin in die RNS nach Gabe von Aldosteron	PORTER, BOGOROCH u. EDELMAN 1964
Harnblase (<i>Bufo marinus</i>)	Ausbleiben des Aldosteron- beschleunigten Na^+ -Transportes 1. bei Hemmung der DNS- abhängigen RNS-Synthese durch Actinomycin D 2. bei Unterbrechung der Proteinsynthese durch Puromycin	FANESTIL u. EDELMAN 1966
Rattenniere	Ausbleiben des durch Aldosteron beschleunigten Na^+ -Transportes adrenal- ektomierter Ratten bei Gabe von Actinomycin D	WILLIAMSON 1963 WIEDERHOLT 1966
Rattenleber		BARTELHEIMER, LOSERT, SITT u. SENFT 1967

Abbildung 1

von ungefähr einer Stunde vergeht (Crabbé, 1963). Da eine Anreicherung von Aldosteron in Kernen von Zellen nachgewiesen wurde, die zu einem unidirektionalen Na^+ -Transport befähigt sind (Edelman, Bogoroch und Porter, 1963), und außerdem der Einbau von Orotat (Fanestil und Edelman, 1965) oder Uridin (Porter, Bogoroch und Edelman, 1964) in Ribonucleinsäure gefördert wird, kann man annehmen, daß während der Latenzzeit zunächst die DNS-abhängige RNS-Synthese und damit auch die Bildung von Proteinen gesteigert wird. Daß eine vermehrte Proteinsynthese die Voraussetzung für die durch Aldosteron bedingte Beschleunigung des Na^+ -Transportes darstellt, geht aus Versuchen hervor, nach denen bei Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Bildung durch Actinomycin D (Horbers und Muller, 1962) oder Unterbrechung der Proteinsynthese durch Puromycin (Yarmolinsky und de la Haba, 1959; Rabinowitz und Fisher, 1962) ebenfalls die Beschleunigung des Na^+ -Transportes durch das Mineralocorticoid ausbleibt. Dies wurde bei Untersuchungen an der Rattenniere (Williamson, 1963; Wiederholt, 1966) und an der isolierten Harnblase von Bufo marinus festgestellt (Fanestil und Edelman, 1966). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß auch eine extrarenale Wirkung von Aldosteron, die sich in einer Steigerung des Na^+ -Konzentrationsquotienten zwischen dem intra- und extrazellulären Raum der Leber äußert (Dulce und Günther, 1960; Losert, Senft und Senft, 1964), durch Actinomycin D verhindert wird (Bartelheimer, Losert, Senft und Sitt, 1967).

Unbeantwortet bleibt die Frage, welche Enzymproteine unter dem Einfluß des Mineralocorticoids vermehrt synthetisiert werden. Sharp, Lichtensein, Coggins und Leaf (1966) sowie Sharp und Leaf (1966) nehmen an, daß Aldosteron die Bildung einer "Permease" induziert. Hierdurch soll die Permeabilität für Na^+ -Ionen erhöht werden, so daß diese entlang einem Konzentrationsquotienten in vermehrtem Maße in die Zelle gelangen und damit durch Erhöhung des "Substrat"-($=\text{Na}^+$)-angebotes den Natriumauswärtstransport beschleunigen. Diese Theorie kann die Beschleunigung des Na^+ -Transportes durch Aldosteron in solchen Organen erklären, die zu einem unidirektionalen Transport von Na^+ -Ionen befähigt sind. Dies gilt z.B. für die Nieren, wo der Na^+ -Nettotransport aus dem Primärharn durch die Tubuluszellen in das peritubuläre

Blut gerichtet ist. An der isolierten Harnblase von *Bufo marinus*, an der Sharp, Coggins, Lichtensein und Leaf (1966) ihre Befunde erhoben haben, liegen vergleichbare Bedingungen vor. Die durch Aldosteron induzierte "Permease" müßte demnach an der Mucosa- bzw. luminalen Zellmembran, der eigentliche Transportmechanismus an der Serosa- bzw. peritubulären Membran lokalisiert sein.

Setzt man voraus, daß der Steigerung des Natriumtransportes in der Leber ein prinzipiell gleicher Mechanismus wie in der Niere zugrunde liegt, bereitet es Schwierigkeiten, diese mit Hilfe der "Permease-Theorie" zu erklären. Bei adrenaletomierten Tieren ist als Folge des gestörten zellulären Natriumtransportes die intrazelluläre Konzentration des Elektrolyten erhöht. Dieser Zustand wird durch Behandlung der Tiere mit Aldosteron wieder normalisiert (Dulce und Günther, 1960; Losert, Senft und Senft, 1964). Käme es als Folge der Aldosteronwirkung zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität, so müßte unter dem Einfluß des Hormons jedoch die zelluläre Natriumkonzentration weiter ansteigen, damit der " Na^+ -Pumpe" mehr Substrat zum Auswärtstransport angeboten werden kann.

Im Gegensatz zu der von Leaf und Mitarbeitern aufgestellten "Permease-Theorie" läßt sich die von Edelman (1966a; 1966b) und Fimognari, Porter und Edelman (1967) aufgrund von Untersuchungen an der isolierten Harnblase von *Bufo marinus* vertretene Ansicht, nach der Aldosteron eine vermehrte Bildung von Enzymen des Tricarbonsäurecyklus induziert, sowohl zur Erklärung der renalen wie der extrarenalen Effekte des Mineralocorticoids heranziehen. Diese Autoren fanden, daß Aldosteron ausschließlich unter aeroben Bedingungen wirkt und ein Zusatz des Hormons nur dann zu einer Beschleunigung des Natriumtransportes führt, wenn in der Inkubationsflüssigkeit entweder Pyruvat, Oxalacetat, Acetyl-Coenzym A oder β -Hydroxy-butyrat vorhanden waren. Wurden dagegen Propionat oder Succinat als Substrate angeboten, so führte Aldosteron nicht zu einer Beschleunigung des Natriumtransportes. Die Autoren haben deshalb vermutet, daß das Hormon die Synthese eines oder mehrerer Enzyme in der Reaktionskette zwischen Oxalacetat und Succinyl-Coenzym A erhöht oder zu einer Aktivitätssteigerung der mitochondrialen NADH_2 -Dehydrogenase führt (Abb. 2).

Von diesen Befunden ausgehend wurde untersucht, ob in der Ratten- niere die Aktivität eines oder mehrerer in diesem Stoffwechsel- weg lokalisierter Enzyme nach Entfernung der Nebennieren abnimmt und bei Substitution der adrenaletomierten Tiere mit Aldosteron wieder ansteigt. In diese Untersuchungen wurden Triamteren und Amilorid eingeschlossen. Die tubulären Effekte dieser Diuretica verhalten sich ähnlich wie ein Aldosteronmangel, ohne daß für ihre Wirkung die Anwesenheit des Mineralocorticoids notwendig ist (Liddle, 1961; Herken und Senft, 1961; Senft, 1962; Baer, 1966; Baer, Jones, Spitzer und Russo, 1967). Deshalb wurde ge- prüft, ob die Aktivität von Enzymen des Tricarbonsäurecyklus durch Triamteren und Amilorid in diuretisch wirksamen Dosen ver- ändert wird.

Die Untersuchungen wurden jeweils zu dem Zeitpunkt durchgeführt, an dem eine maximale Beeinflussung des tubulären Natriumtrans- portes durch Aldosteron, Triamteren und Amilorid nachweisbar ist.

Methodik

1. Tiermaterial und Vorbereitung der Tiere

Die Versuche wurden an männlichen Wistarratten mit einem Körpergewicht zwischen 180 und 220 g durchgeführt. Die Tiere erhielten Leitungswasser und Altromin R-Trockenfutter, das ihnen zu Beginn der Experimente entzogen wurde. Versuche an adrenaletomierten Tieren wurden vier Tage nach Entfernung der Nebennieren vorgenommen. Als Trinkflüssigkeit erhielten diese Ratten physiologische Kochsalzlösung.

2. Dosierung und Einwirkungsdauer der verwendeten Hormone und Pharmaka

d-Aldosteron¹ wurde in einer Dosis von je 10 µg/Tier in 0,9 %iger NaCl-Lösung 180 und 90 Minuten vor der Gewebsentnahme intraperitoneal injiziert. Triamteren² (10 mg/kg Körpergewicht) wurde den Ratten in einer Gummi arabicum-Suspension durch eine Schlundsonde gegeben, Amilorid als Hydrochlorid³ in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht in physiologischer NaCl-Lösung intravenös injiziert. Die Entnahme der Nieren erfolgte jeweils eine Stunde nach Gabe der Diuretica. Kontrollen erhielten das Lösungsmittel. In einer Versuchsreihe wurde jeweils die gleiche Anzahl von behandelten und nicht behandelten, bzw. adrenaletomierten und nicht adrenaletomierten Ratten untersucht.

3. Aufarbeitung der Nieren

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Nieren sofort entnommen, gewogen und eine Minute lang im 10fachen Volumen einer eisgekühlten 0,32 M Saccharose-Lösung homogenisiert, die 0,02 M Tris und 0,5 mM EDTA enthielt (Teflon-

1: d-Aldosteron: Aldocorten^R (CIBA-AG, Basel)

2: Triamteren: 2,4,6-Triamino-6-phenyl-pteridin, Jatropur^R (Röhm und Haas, Darmstadt)

3: Amilorid: N-Amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazincarboxamid-hydrochlorid, Amipramidin, Amipramizid, DCP, MK 870 (Sharp & Dohme G.m.b.H., München)

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Brunner (CIBA-AG, Basel) und Herrn Dr. H.F. Hofmann (Sharp & Dohme G.m.b.H., München) für die Überlassung von Aldosteron und Amilorid.

Glashomogenisator, Modell: Potter Elvehjem). Der pH dieser Lösung war vorher mit HCl auf 7,4 eingestellt worden. Das Homogenat wurde danach 20 Minuten lang in einer Sorvall-Kühlzentrifuge bei 0 °C und 1000·g abgefahren. Der Überstand wurde anschließend zur Trennung der mitochondrialen, mikrosomalen und hyaloplasmatischen Enzymaktivitäten einer Differentialzentrifugation unterworfen. Hierzu wurde er erneut 20 Minuten lang bei 1000·g zentrifugiert und anschließend dekantiert. Die Mitochondrien wurden 30 Minuten lang bei 0 °C und 10 000·g abgefahren. Das Sediment wurde in 10 ml des eisgekühlten Puffers gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (30 Min., 10 000·g) in 3 ml Puffer aufgenommen. In dieser Suspension wurde die Aktivität der untersuchten mitochondrialen Enzyme gemessen. Zur Trennung der mikrosomalen von der hyaloplasmatischen Fraktion wurde der 10 000·g-Überstand eine Stunde lang bei 100 000·g in einer Beckman-Ultrazentrifuge (0 °C) abgefahren. Im Überstand wurde die Aktivität der hyaloplasmatischen, in dem in 3 ml Puffer (s.o.) aufgenommenen Sediment die Aktivität der mikrosomalen Enzyme gemessen.

Die Messungen erfolgten im optischen Test. Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt des jeweiligen Homogenats bezogen. Zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der Citrat-Synthase, Aconitase, NADP-Isocitratdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und α -Ketoglutaratdehydrogenase wurden die suspendierten Mitochondrien durch einen Zusatz von einer 4 %igen Triton X-100-Lösung im Verhältnis 1 : 10 aufgelöst.

4. Untersuchte Enzyme

I. Mitochondrale Fraktion (10 000·g-Sediment)

Citrat-Synthase ((citrate-oxaloacetate-lyase (Co A acetylating)
EC 4.1.3.7.))

Aconitase ((citrate(isocitrate)-hydro-lyase EC 4.2.1.3.))

NADP-Isocitratdehydrogenase ((D_g-isocitrate:NADP oxidoreductase
(decarboxylating) EC 1.1.1.42))

Glutamatdehydrogenase ((L-glutamate:NAD(P) oxydoreductase
(deaminating) EC 1.4.1.3))

α -Ketoglutaratdehydrogenase ((2-oxyglutarate:lipooate oxydo-
reductase (decarboxylating) EC 1.2.4.2.))

NADH₂Cytochrom_c-Reduktase ((NADH₂:cytochrome_c oxydoreductase
EC 1.6.2.1))

Succinoxidase ((succinate:(acceptor) oxydoreductase EC 1.3.99.1))

II. Mikrosomale Fraktion (100 000-g-Sediment)

NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase ((NADPH₂:cytochrome_c oxydoreductase
EC 1.6.2.3))

III. Hyaloplasmatische Fraktion (100 000-g-Überstand)

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ((D-glucose-6-phosphate:NADP
oxydoreductase EC 1.1.1.49))

5. Bestimmungsmethoden der untersuchten Enzyme

I. Citrat-Synthase (CS)

Die Enzymaktivität wurde nach der bei Wieland (1966) veröffentlichten Methode von Stern, Shapiro, Stadtman und Ochoa (1951) gemessen. Dieser Test beruht auf folgender Reaktion:

(1) Malat + NAD⁺ Malatdehydrogenase (MDH) NADH+H⁺ + Oxalacetat

(2) Oxalacetat + Acetyl-CoA $\xrightleftharpoons{\text{CS}}$ Citrat

(1+2) Malat + NAD⁺ + Acetyl-CoA $\xrightleftharpoons[\text{MDH}]{\text{CS}}$ Citrat + NADH+H⁺

Zunächst stellt sich ein Gleichgewicht zwischen NAD und NADH+H⁺ ein (Gl. 1). Durch Zugabe von Acetyl-CoA wird Oxalacetat verbraucht (Gl. 2) und unter Reduktion einer äquimolaren Menge von NAD nachgebildet. Hierbei entsteht so viel NADH₂, wie Acetyl-CoA unter dem Einfluß der Citrat-Synthase umgesetzt wird. Der Anstieg der NADH₂-Konzentration kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ fortlaufend registriert werden.

Diese Methode wurde ursprünglich zur Standardisierung von gereinigten Enzympräparaten angegeben. Zur Messung der Citrat-Synthase-Aktivität roher Gewebsextrakte eignet sie sich nur nach Zusatz von Cyanid, da sonst das gebildete NADH₂ wieder durch die NADH₂-Oxydaseaktivität des Gewebes zu NAD oxydiert wird. Nach Zugabe von Cyanid erreicht zwar die Citrat-Synthase nicht ihre volle Aktivität, die Bildung von NADH₂ erfolgt jedoch linear zur Menge der in die Bestimmung eingesetzten Enzympräparation.

Die Messung erfolgte bei 21 °C mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 1,2 ml Inhalt. Der Inkubationsansatz enthielt in 1 ml 0,05 mmol Tris (pH 7,4); 0,01 mmol l-Äpfelsäure; 0,01 mmol KCl; 0,005 mmol KCN und 0,025 μ mol NAD. Außerdem wurden 5 μ l Malatdehydrogenase Suspension (L-malate:NAD oxydo-reductase EC 1.1.1.37; 5 mg Eiweiß/ml; Boehringer & Soehne, Mannheim) sowie 10 oder 20 μ l der Mitochondrien-Suspension zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l Acetyl-CoA (0,14 μ mol) gestartet und der Anstieg der Absorption bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ während der ersten 5 Minuten registriert. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH_2 , der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ $6,20 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ beträgt.

Die Aktivität errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$\frac{\Delta E \cdot 0,161 \cdot \text{C}\ddot{\text{u}}\text{v. vol.}}{\text{Mit. vol.} \cdot P \cdot t} \quad \text{in der Dimension nmol Acetyl-CoA/mg Protein und Minute}$$

Hierbei bedeutet: ΔE = Extinktionsanstieg in 5 Minuten

0,161 = μ mol $\text{NADH} + \text{H}^+$ pro ΔE von 1,0 bei einem Volumen von 1 ml und einer Schichtdicke von 1 cm

Cuv.vol. = Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes (1,045 ml)

Mit.vol. = Volumen der zugegebenen Mitochondrien-Suspension (0,02 ml)

P = Proteingehalt der Mitochondrien-Suspension (in mg/ml)

t = Zeit in Minuten (5 Min.)

II. Aconitase

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach Angaben von Anfinsen (1955), die auf der von Racker (1950) publizierten Methode beruht.

Sie verläuft nach folgender Reaktion:



Citrat, cis-Aconitat und Isocitrat stehen in einem Gleichgewicht. Wird Citrat als Substrat vorgelegt, so kann das gebildete cis-Aconitat bei einer Wellenlänge von $\lambda = 240 \text{ m}\mu$ durch eine Zunahme der Absorption direkt spektralphotometrisch gemessen werden.

Die Messung erfolgte mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21°C . Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 0,15 mmol KH_2PO_4 (pH 7,4) und 0,09 mmol Citronensäure. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml Mitochondrien-Suspension gestartet. Der Absorptionsanstieg wurde 5 Minuten lang registriert. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von cis-Aconitat, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 240 \text{ m}\mu$ $3,68 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ beträgt, wie in Vorversuchen ermittelt wurde.

Die Aktivität errechnet sich in der Dimension nmol cis-Aconitat pro mg Protein und Minute nach folgender Gleichung:

$$\frac{\Delta E \cdot 0,272 \cdot \text{c}\ddot{\text{u}}\text{v. vol.}}{\text{Mit. vol.} \cdot t \cdot P}$$

Hierbei bedeutet: ΔE	= Extinktionsanstieg in 5 Minuten
0,272	= μmol cis-Aconitat pro ΔE von 1,0 bei einem Volumen von 1 ml und einer Schichtdicke von 1 cm
Cüv.vol.	= Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes (3,5 ml)
t	= Zeit in Minuten (5 Min.)
P	= Proteingehalt der Mitochondrien-Suspension (in mg/ml)
Mit.vol.	= Volumen der zugegebenen Mitochondrien-Suspension (0,5 ml)

III. NADP-Isocitratdehydrogenase (ISDH)

Die Aktivität dieses Enzyms wurde entsprechend den Angaben von Kornberg (1955) nach dem Verfahren von Ochoa (1948) gemessen. Die Methode beruht auf folgender Reaktion:



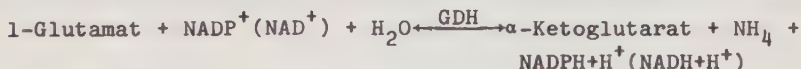
Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ wird der Absorptionsanstieg gemessen, der auf die Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zurückzuführen ist.

Die Messung erfolgte mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21°C . Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 75 μmol Glycylglycin (pH 7,4); 1,8 μmol MnSO_4 ; 2,4 μmol dl-Isocitrat und 0,26 μmol NADP. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Mitochondrien-Suspension gestartet. Der Absorptionsanstieg wurde 5 Minuten lang registriert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in gleicher Weise wie die der Citrat-Synthase, da auch der Extinktionskoeffizient von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ einen Wert von $6,2 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ hat. Den unterschiedlichen Volumina wurde Rechnung getragen. Die Aktivität wurde in der Dimension $\text{nmol NADPH}_2/\text{mg Protein und Minute}$ angegeben.

IV. Glutamatdehydrogenase (GDH)

Die Aktivität dieses Enzyms wurde nach den Angaben von Bäsler (1964) gemessen, die auf dem Verfahren von Olsen und Anfinsen (1952) beruhen. Der Test verläuft nach folgender Reaktion:



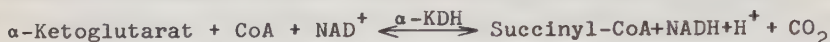
Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ kann die Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+(\text{NADH} + \text{H}^+)$ fortlaufend registriert werden.

Die Messung erfolgte mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21°C . Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde NADP als Coenzym verwendet. Der Inkubationsansatz enthielt in 2,5 ml 400 μmol KH_2PO_4 (pH 7,7); 56 μmol l-Glutaminsäure und 1,3 μmol NADP. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml Mitochondrien-Suspension gestartet. Die Absorptionzunahme wurde 5 Minuten lang registriert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in gleicher Weise wie die der Citrat-Synthase. Den unterschiedlichen Volumina wurde Rechnung getragen. Die Aktivität wurde in der Dimension $\text{nmol NADPH}_2/(\text{mg Prot.} \cdot \text{min.})$ angegeben.

V. α -Ketoglutaratdehydrogenase (α -KDH)

Die Aktivität wurde nach den Angaben von Kaufman (1955) durchgeführt. Die Methode beruht auf folgender Reaktion:



Die Zunahme der NADH_2 -Konzentration kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ fortlaufend registriert werden. Gegenüber den Originalangaben von Kaufman wurde folgende Modifikation durchgeführt: Dem Reaktionsansatz wurde KCN in einer Konzentration von 0,01 M zugesetzt, um eine Oxydation des gebildeten NADH_2 als Folge der in den Mitochondrien enthaltenen NADH_2 -Oxydaseaktivität zu verhindern. Nach Zugabe von KCN erreicht zwar das Enzym nicht seine volle Aktivität, Vorversuche ergaben jedoch eine lineare Abhängigkeit des gebildeten NADH_2 von der Menge der eingesetzten Enzympräparation. Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 100 μmol KH_2PO_4 (pH 7,4); 8,3 μmol Cysteinchlorid; 0,39 μmol Coenzym A; 0,27 μmol NAD; 30 μmol KCN und 50 μmol α -Ketoglutar säure.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl der Mitochondrien-Suspension gestartet und anschließend die Extinktionszunahme 5 Minuten lang bei 21 °C in einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) registriert. Die Absorption steigt während dieser Zeit linear an.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in gleicher Weise wie die der bereits erwähnten Enzyme. Die unterschiedlichen Volumina wurden berücksichtigt; die Aktivität wurde in der Dimension $\text{nmol NADH}_2/(\text{mg Prot.} \cdot \text{min.})$ angegeben.

VI. Succinatdehydrogenase (SDH)

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach den bei Bonner (1955) mitgeteilten Angaben von Slater und Bonner (1952). Die Methode beruht auf folgender Reaktion:



Die Succinatdehydrogenase oxydiert Succinat nicht nur in Gegenwart der natürlichen Elektronenakzeptoren, d.h. der mitochondrialen Cytochrome, sondern auch bei Anwesenheit von Ferricyanid, das dabei zu Ferrocyanid reduziert wird. Die Abnahme der Ferricyanidkonzentration kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406 \text{ m}\mu$

fortlaufend registriert werden. Die Messungen wurden in einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21 °C durchgeführt.

Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 100 µmol KH_2PO_4 (pH 7,2); 30 µmol KCN; 3 µmol $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und 40 µmol Natriumsuccinat, sowie einen Zusatz von Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 5 mg/ml. Die Reaktion wurde mit 0,1 ml Mitochondrien-Suspension gestartet. Die Absorptionsabnahme wurde 5 Minuten lang registriert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von $[\text{Fe}^{+++}(\text{CN})_6]^{---}$, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406 \text{ m}\mu$ $1,072 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ beträgt, wie in Vorversuchen ermittelt wurde.

Die mitochondriale Enzymaktivität wurde in der Dimension nmol Succinat/(mg Prot.·min.) nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\Delta E \cdot 0,933 \cdot \text{Cüv.vol.}}{\text{Mit.vol.} \cdot t \cdot P}$$

Hierbei bedeutet:

ΔE	= Extinktionsanstieg in 5 Minuten
0,933	= µmol Succinat pro ΔE von 1,0 bei einem Volumen von 1 ml und einer Schichtdicke von 1 cm
Cüv.vol.	= Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes (3,1 ml)
Mit.vol.	= Volumen der zugegebenen Mitochondrien-Suspension (0,1 ml)
t	= Zeit in Minuten (5 Minuten)
P	= Proteingehalt der Mitochondrien-Suspension (in mg/ml)

VII. NADH_2 -Cytochrom_c-Reduktase

Die Aktivität dieses Enzyms wurde nach den Angaben von Green und Ziegler (1963) bestimmt. Die Methode beruht auf folgender Reaktion:



Zur Messung der Umsatzgeschwindigkeit kann entweder die Reduk-

tion von Cytochrom_c als Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von 550 mμ oder die Oxydation von NADH+H⁺ als Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 mμ verfolgt werden. Im ersten Fall bestimmt man die Cytochrom_c-Reduktase- im zweiten Fall die NADH₂-Oxydaseaktivität der Mitochondrien.

Bei den vorliegenden Versuchen wurde die Oxydation des reduzierten Pyridinnukleotids mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21 °C bestimmt.

Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 300 μmol KH₂PO₄ (pH 7,4); 0,5 μmol NADH₂; 2,4 mg Cytochrom_c (Fe⁺⁺⁺); 0,3 μmol EDTA sowie einen Zusatz von Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 5 mg/ml.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl Mitochondrien-Suspension gestartet und anschließend die Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von λ = 340 mμ 5 Minuten lang gemessen.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in gleicher Weise wie diejenige der anderen Enzyme; den unterschiedlichen Volumina wurde Rechnung getragen. Die Aktivität wurde in der Dimension nmol NADH₂/(mg Prot.·min.) angegeben.

VIII. NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase

Die Aktivität dieses mikrosomalen Enzyms wurde in analoger Weise bestimmt wie die Umsatzgeschwindigkeit der mitochondrialen NADH₂-Cytochrom_c-Reduktase (Green und Ziegler, 1963). Die Methode beruht auf folgender Reaktion:



Bei einer Wellenlänge von 340 mμ wurde die Oxydation von NADPH₂ als Absorptionsabnahme mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21 °C gemessen. Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 300 μmol KH₂PO₄ (pH 7,4); 0,3 μmol EDTA; 2,4 mg Cytochrom_c (Fe⁺⁺⁺) und 0,75 μmol NADPH₂ sowie einen Zusatz von Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 5 mg/ml. Die Reaktion wurde durch

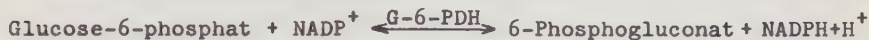
Zugabe von 100 μ l Mikrosomen-Suspension gestartet. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 340 m μ die Absorptionsabnahme 5 Minuten lang registriert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in gleicher Weise wie diejenige der bisher beschriebenen mitochondrialen Enzyme. Die Aktivität wurde in der Dimension nmol NADPH₂/mg mikrosomales Protein und Minute angegeben. Die verschiedenen Volumina wurden berücksichtigt.

IX. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)

Die Aktivität dieses hyaloplasmatischen Enzyms wurde nach den Angaben von Bücher, Luh und Pette (1964); sowie Löhr und Waller (1962) bestimmt.

Die Methode beruht auf folgender Reaktion:



Diese Reaktion kann durch Zunahme der Absorption bei 340 m μ fortlaufend registriert werden.

Die Messung erfolgte mit einem registrierenden Spektralphotometer der Firma Beckman (Modell DK 2A) in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Inhalt bei einer Temperatur von 21 °C.

Der Inkubationsansatz enthielt in 3 ml 150 μ mol Triäthanolamin (pH 7,5); 15 μ mol EDTA; 6 μ mol NADP und 6 μ mol Glucose-6-phosphat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l des 100 000-g-Überstandes gestartet und anschließend die Absorptionzunahme 5 Minuten lang bei $\lambda = 340$ m μ registriert. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte in gleicher Weise wie die der bereits erwähnten Enzyme. Sie wurde in der Dimension nmol NADPH₂/mg hyaloplasmatisches Protein und Minute angegeben.

6. Eiweißbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde jeweils in dem für die Fermentbestimmung benutzten Homogenatanteil nach der von Lowry, Rosenbrough, Farr und Randall (1951) angegebenen Methode bestimmt. Für die Eichreihe wurde Humanalbumin benutzt (reinst; Behringwerke, Marburg/Lahn).

7. Statistische Auswertung

Die Mittelwerte $\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n}$ werden mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_1^2) - \bar{x} \cdot \sum x_1}{n(n-1)}}$$

angegeben.

Ob sich die einzelnen Gruppen signifikant unterscheiden, wurde mit Hilfe des t-Testes geprüft:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(S_{\bar{x}_1})^2 + (S_{\bar{x}_2})^2}}$$

Mit Hilfe der t-Tafeln von Pötau (1943) erhalten wir unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades $F = n_1 + n_2 - 2$ (vorausgesetzt: $n_1 \hat{=} n_2$) die Wahrscheinlichkeit des Unterschiedes (p).

Ergebnisse

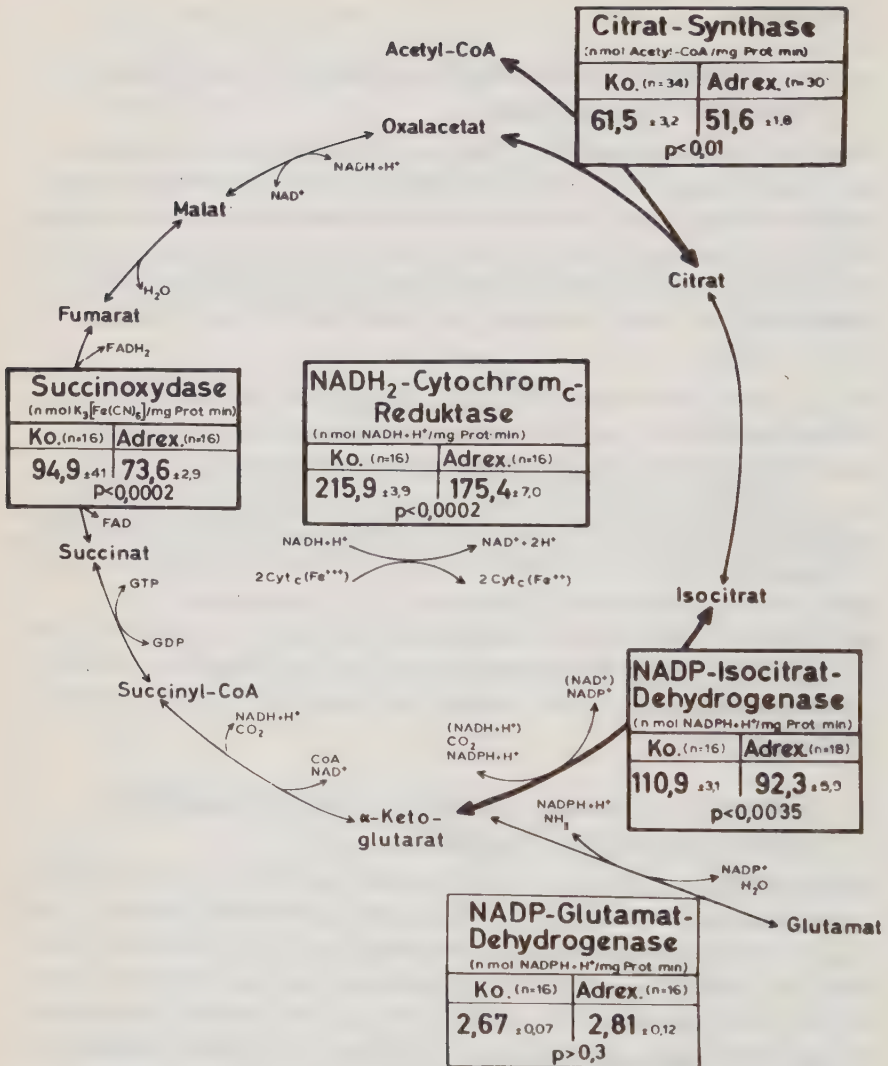
1. Beeinflussung der Aktivität mitochondrialer Enzyme durch Entfernung der Nebennieren

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Aktivität von Enzymen des Tricarbonsäurecyclus in den Mitochondrien der Niere adrenalektomierter Tiere im Vergleich zu Ratten mit Nebennieren verändert. Es wurden sowohl Enzyme untersucht, die in dem von Edelman und Mitarbeitern untersuchten Stoffwechselweg lokalisiert sind als auch Fermente, die außerhalb dieser Reaktionskette liegen.

4 Tage nach Entfernung der Nebennieren hatte die Aktivität der mitochondrialen Ditrat-Synthase um 16 % abgenommen. Auch die NADP-Isocitratdehydrogenase-Aktivität war zu diesem Zeitpunkt um einen nahezu gleichen Wert erniedrigt. Zwei weitere mitochondriale Fermente, die nach Adrenalektomie eine geringere Umsatzgeschwindigkeit aufwiesen, waren die Succinatdehydrogenase und die NADH₂-Cytochrom_c-Reduktase. Die Erniedrigung betrug in diesen Fällen jeweils ungefähr 20 %. Dagegen hatte sich die Aktivität der Glutamatdehydrogenase, die mit NADP als Coenzym bestimmt wurde, gegenüber Ratten mit Nebennieren nicht verändert (Abb. 3).

2. Einfluß von Aldosteron auf die Aktivität mitochondrialer Enzyme adrenalektomierter Tiere

Eine Abnahme von Enzymaktivitäten nach Entfernen der Nebennieren besagt natürlich noch nicht, daß diese Veränderung auf das Fehlen von Mineralocorticoiden zurückzuführen ist. Es könnte sich auch um einen Effekt handeln, der durch den Ausfall von Glucocorticoiden bedingt ist, oder die Folge von Elektrolytverschiebungen darstellt, die unter dem Einfluß eines Aldosteronmangels aufgetreten sind. Aus diesen Gründen wurde geprüft, ob eine Gabe von Aldosterondosen, die mit den von Cade und Perenich (1965) ermittelten Sekretionsraten vergleichbar sind, zu einer Normalisierung der bei adrenalektomierten Tieren erniedrigten Enzymaktivitäten führt. Die Untersuchungen wurden nach zwei Injektionen von 10 µg d-Aldosteron 180 und 90 Minuten vor Entnahme der Gewebe durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ist eine maximale



Abnahme von Enzymaktivitäten in den Mitochondrien der Niere nach Entfernung der Nebennieren

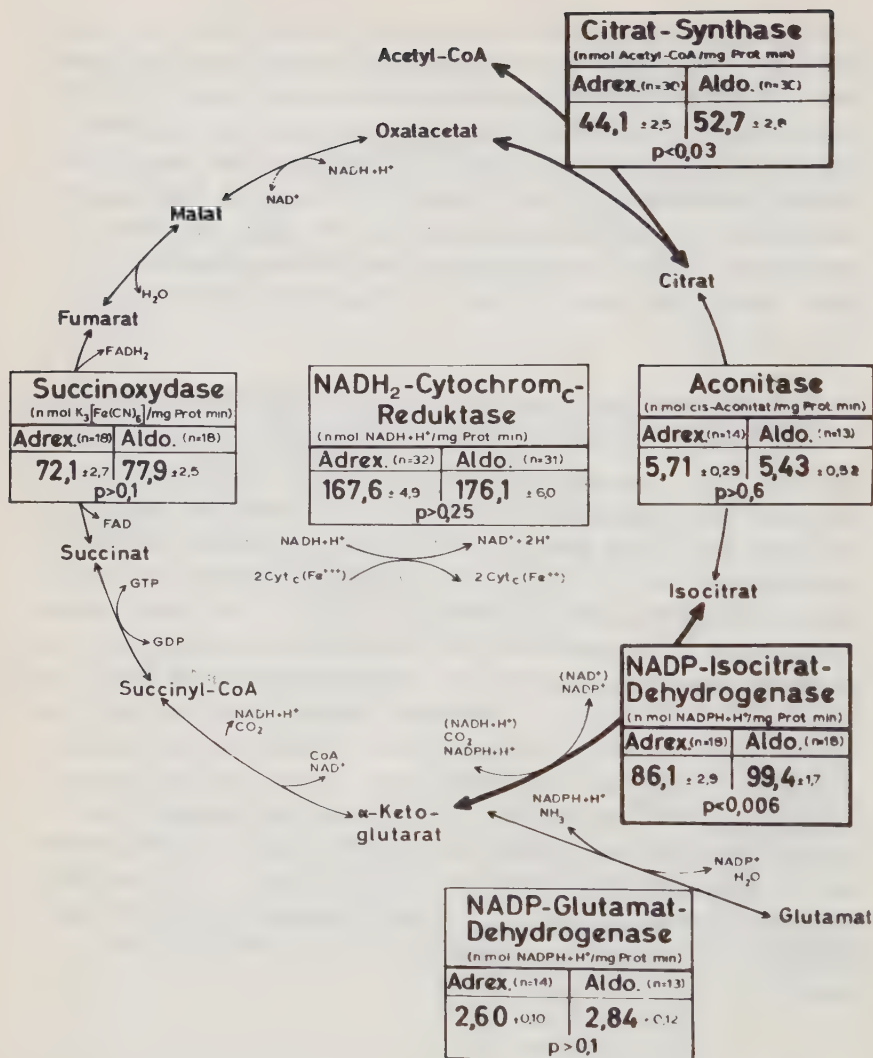
Ko.: Tiere mit Nebennieren Adrex.: adrenaletomierte Ratten

Abbildung 3

Na^+ -Retention zu beobachten (Sitt und Losert, 1967). Es zeigte sich, daß die Aktivitäten der mitochondrialen Citrat-Synthase sowie der NADP-Isocitratdehydrogenase um den gleichen Prozentsatz ansteigen, um den sie nach der Adrenalektomie abgenommen hatten. Dagegen wurde die Aktivität der Aconitase und (NADP)-Glutamatdehydrogenase nicht beeinflusst. Auch die Umsatzgeschwindigkeit der Succinatdehydrogenase und der NADH_2 -Cytochrom_c-Reduktase, die bei adrenalektomierten Tieren erniedrigt war, wurde durch eine Substitution mit Aldosteron nicht verändert (Abb. 4).

3. Beeinflussung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität durch Adrenalektomie und Gabe von Aldosteron

Die durch die Isocitratdehydrogenase katalysierte Umsetzung ist eine der wesentlichen Reaktionen, mit deren Hilfe NADPH_2 gebildet wird. Eine weitere wichtige Reaktionskette zur Bereitstellung von NADPH_2 ist der Pentosephosphatcyklus, der durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase eingeleitet wird. Deshalb wurde geprüft, ob auch diese NADP-abhängige Dehydrogenase, die im Hyaloplasma lokalisiert ist, durch Aldosteron in ihrer Aktivität beeinflusst wird. Die Versuche ergaben, daß die Aktivität dieses Fermentes nach Entfernung der Nebennieren von 8,9 auf 10,5 nmol NADPH_2 /mg Protein und Minute ansteigt. Eine Behandlung der adrenalektomierten Tiere mit Aldosteron führte zu keiner signifikanten Veränderung der bei diesen Ratten gesteigerten Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms (Abb. 5), so daß der Einfluß des Mineralocorticoids den Edelmanschen Vorstellungen entsprechend auf mitochondriale Enzyme beschränkt zu sein scheint.



Anstieg von Enzymaktivitäten in den Mitochondrien der Niere adrenaletomierter Ratten nach Gabe von Aldosteron

Adrex.: adrenaletomierte Ratten

Aldo: adrenaletomierte Ratten nach 2x10 µg d-Aldosteron/Tier (3 bzw. 1,5 Std. vor Gewebseinnahme)

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (nmol NADPH+H ⁺ /mg Prot.:min)			
Ko. (n=16)	Adrex. (n=16)	Adrex. (n=16)	Aldo. (n=16)
8,91 ±0,26	10,52 ±0,32	10,52 ±0,26	10,00 ±0,66
p<0,0006		p>0,5	

Glucose-6-phosphat → 6-Phosphogluconat
 NADP⁺ → NADPH+H⁺

Einfluss von Aldosteron auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Hyaloplasma) in der Rattenniere

Ko.: Ratten mit Nebennieren

Adrex.: adrenaletomierte Tiere

Aldo.: adrenaletomierte Ratten nach Gabe von 2x10µg d-Aldosteron/Tier (3 bzw. 1,5 Std. vor Gewebesenahme)

Abbildung 5

4. Aktivitätsveränderungen der mikrosomalen NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase nach Entfernung der Nebennieren und Gabe von Aldosteron

Bei der Messung der Aktivität eines im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten NADPH₂ abhängigen Fermentes, der NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase, ergab sich jedoch, daß diese bei adrenaletomierten Ratten um 20 % abnimmt. Erhielten diese Tiere 20 µg d-Aldosteron, so stieg die Aktivität dieses Enzyms wieder an, erreichte jedoch nicht die bei Ratten mit Nebennieren gemessenen Werte. Der Effekt des Mineralocorticoids war jedoch in allen Versuchen statistisch signifikant (Abb. 6).

NADPH ₂ -Cytochrom(c)- Reduktase			
(n mol NADPH·H ⁺ /mg Prot.·min)			
Ko. (n=49)	Adrex. (n=49)	Adrex. (n=64)	Aldo. (n=66)
15,41 ±0,46	12,30 ±0,32	13,12 ±0,38	14,26 ±0,42
p<0,0002		p<0,05	



Einfluss von Aldosteron auf die Aktivität der mikrosomalen NADPH₂-Cytochrom(c)- Reduktase

Ko.: Tiere mit Nebennieren

Adrex.: adrenaletomierte Ratten

Aldo.: adrenaletomierte Ratten nach Gabe von
2x10 µg d-Aldosteron/Tier (3 bzw. 1,5 Std.
vor Gewebsentnahme)

Abbildung 6

5. Einfluß von Triamteren und Amilorid auf die Aktivität der mikrosomalen NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase

Ausgehend von diesen Befunden wurde untersucht, ob nach Gabe von Triamteren und Amilorid Aktivitätsveränderungen auftreten, die in den gleichen Stoffwechselwegen wie die Fermente lokalisiert sind, deren Umsatzgeschwindigkeit durch Aldosteron beeinflusst wird. Die Untersuchungen wurden eine Stunde nach oraler Gabe von 10 mg/kg Triamteren oder intravenöser Injektion von 2 mg/kg Amilorid durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wird nach Gabe beider Pharmaka in der genannten Dosis eine maximale Steigerung der renalen Natriumelimination gemessen (Herken, 1968; Losert, Sitt, Senft und Zesch, 1967).

Die Aktivität der mikrosomalen NADPH₂-Cytochrom_c-Reduktase wurde weder durch die Gabe von Triamteren noch durch Applikation von Amilorid beeinflusst. Die Versuche mit Triamteren wurden an adrenaletomierten Ratten durchgeführt (Abb. 7).

NADPH₂-CYTOCHROM(c)- REDUKTASE (nmol NADPH·H ⁺ /mg Prot·min)			
Ko. (n=12)	Triamt. (n=12) (adrenalekt. Tiere)	Ko. (n=12) (Tiere mit Nebennieren)	Amilor. (n=12)
10,71 ± 0,46	10,02 ± 0,38	11,16 ± 0,32	11,40 ± 0,46
p>0,2		p>0,6	



**Keine Beeinflussung der mikrosomalen
NADPH₂-Reduktase-Aktivität durch
Triamteren u. Amilorid**

Ko.: Kontrollen

Triamt.: 10 mg/kg Triamteren p.o., 1 Std.

Amilor.: 2 mg/kg Amilorid (hydrochlorid) i.v., 1 Std.

Abbildung 7

6. Aktivitätsänderungen mitochondrialer Enzyme unter dem Einfluß von Triamteren und Amilorid

Nach den Untersuchungen von Losert, Sitt, Senft und Zesch (1967) wird die Aktivität der mitochondrialen NADP-Isocitratdehydrogenase durch Amilorid nicht verändert. Es wurde deshalb geprüft, ob die Aktivität eines Enzyms des Tricarbonsäurecyklus durch

α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (n mol NADH+H ⁺ /mg Prot.·min)			
Tiere mit Nebennieren			
Ko. (n=15)	Triamt. (n=15)	Ko. (n=12)	Amilor. (n=12)
29,1 ±1,4	20,8 ±0,9	26,5 ±1,3	21,8 ±1,2
p<0,0002		p<0,02	
Adrenalektomierte Ratten			
Ko. (n=27)	Triamt. (n=27)	Ko. (n=12)	Amilor. (n=12)
28,5 ±0,9	25,0 ±1,0	26,1 ±1,4	20,9 ±0,9
p<0,02		p<0,006	



Abnahme der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität (Mitochondrien) in der Niere von Ratten mit und ohne Nebennieren nach Gabe von Triamteren bzw. Amilorid

Ko.: Kontrollen

Triamt.: 10mg/kg Triamteren p.o., 1Std.

Amilor.: 2 mg/kg Amilorid(hydrochlorid) i.v., 1Std.

Abbildung 8

diese Diuretica verändert wird, das außerhalb des von Edelman und Mitarbeitern für die Wirkung des Aldosterons verantwortlich gemachten Stoffwechselweges liegt. Es zeigte sich, daß die Umsatzgeschwindigkeit der mitochondrialen α -Ketoglutaratdehydrogenase durch eine Behandlung mit Triamteren und Amilorid sowohl bei Tieren mit Nebennieren als auch bei adrenalektomierten Ratten erniedrigt wird (Abb. 8). Losert, Sitt, Senft und Zesch (1967) konnten zeigen, daß die Aktivität dieses Fermentes durch Aldosteron nicht beeinflusst wird.

Diskussion

Der Befund, daß die mitochondriale Citrat-Synthase und NADP-Isocitratdehydrogenase nach Entfernung der Nebennieren abnimmt und durch Behandlung mit Aldosteron wieder ansteigt, stimmt grundsätzlich mit der von Edelman und Mitarbeitern aufgestellten Theorie überein, nach der die durch Mineralocorticoide bewirkte Steigerung des Na^+ -Transportes auf eine Induktion von Enzymproteinen des Tricarbonsäurecyklus beruhen soll. Die auftretenden Veränderungen sind allerdings nicht sehr groß, so daß zunächst noch nicht entschieden werden kann, ob dadurch die Geschwindigkeit dieses Stoffwechselweges entscheidend beeinflusst wird. Außerdem werden durch die Citrat-Synthase und NADP-Isocitratdehydrogenase keine Reaktionen katalysiert, bei denen eine energiereiche Verbindung entsteht oder NADH_2 gebildet wird, das in der Atmungskette unter Energiegewinnung oxydiert werden kann. Durch die erhöhte Aktivität der NADP-Isocitratdehydrogenase wird zwar in vermehrtem Maße NADPH_2 gebildet, die Oxydation dieses reduzierten Pyridinnucleotids erfolgt jedoch nicht über die Atmungskette und ist daher nicht mit einer oxydativen Phosphorylierung verbunden (Kaplan, Swartz, Frech und Ciotti, 1956). Ein Enzym, das NADPH_2 mit Hilfe von Cytochromen oxydiert, ist fast ausschließlich in den Mikrosomen lokalisiert (Phillips und Langdon, 1962; Masters und Kamin, 1965; Williams und Kamin, 1962), die Mitochondrien enthalten nur einen verschwindend kleinen Anteil der gesamten NADPH_2 -Cytochrom_c-Reduktase-Aktivität der Zelle (Phillips und Langdon, 1962). Es wäre allerdings möglich, daß NADPH_2 mit Hilfe einer Transhydrogenase, die in den Mitochondrien vorkommt (Kaplan, Swartz, Frech und Ciotti, 1956), nach der Reaktion:



zunächst in NADH_2 umgewandelt wird, das dann seinerseits in der Atmungskette unter Energiegewinnung oxydiert werden kann. Man muß dabei jedoch berücksichtigen, daß NADPH_2 primär für andere Stoffwechselwege benötigt wird. Nach den Angaben von Klingenberg und Pette (1962) sowie Goebel und Pette (1967) wird das intramitochondrial gebildete NADPH_2 zur Synthese von Fettsäuren und Aminosäuren (reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat mit Hilfe

der Glutamatdehydrogenase) benötigt. Zur Energiegewinnung dient nach Angaben dieser Autoren nur die Oxydation von NADH_2 , das u.a. durch die Wirkung einer NAD-spezifischen Isocitratdehydrogenase bei der Dehydrierung von Isocitrat entsteht.

Die Aktivitätsabnahme der mitochondrialen Succinatdehydrogenase und NADH_2 -Cytochrom_c-Reduktase nach Entfernung der Nebennieren kann nicht auf das Fehlen von Mineralocorticoiden zurückgeführt werden, da eine einmalige Injektion von Aldosteron keinen Wiederanstieg der Umsatzgeschwindigkeit zur Folge hatte. Die verwendete Dosis des Hormons bewirkte jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchungen eine maximale Beschleunigung des Natriumtransportes (Sitt und Losert, 1967).

Bei chronischer Substitution mit Aldosteron lag dagegen die Aktivität der beiden Fermente nicht niedriger als bei Ratten mit Nebennieren (Losert, Sitt, Senft und Zesch, 1967). Es ist daher möglich, daß die Aktivitätsabnahme bei adrenalektomierten Tieren eine Folge der durch die Entfernung der Nebennieren bedingten Elektrolytverluste darstellt. Diese Möglichkeit muß auch für den Anstieg der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität diskutiert werden, der bei adrenalektomierten Tieren gemessen wurde. Dies und Lotspeich (1967) haben gefunden, daß die Aktivität dieses Enzyms nach Salzverlusten ansteigt, unabhängig davon, ob die Ratten adrenalektomiert waren oder nicht. Der Aktivitätsanstieg der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nach Entfernung der Nebennieren kann auf dem Ausfall der Glucocorticoide beruhen. Pfeiffer und Muller (1967) haben beobachtet, daß diese Hormone die Gesamtaktivität der NADP-abhängigen Enzyme des Pentosephosphatcyklus der Darmmucosa erniedrigen. Ein hemmender Einfluß von Glucocorticoiden auf die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde auch in vitro von Hohenwallner (1967) an dem aus Erythrocyten gewonnenen Ferment gemessen.

Der Anstieg der bei adrenalektomierten Tieren erniedrigten Aktivität der mikrosomalen NADPH_2 -Cytochrom_c-Reduktase nach Gabe von Aldosteron zeigt, daß entgegen den Vorstellungen von Edelman und Mitarbeitern der Einfluß des Hormons nicht auf mitochondriale Enzyme beschränkt ist. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Castles und Williamson (1967) interessant. Diese Autoren haben gefunden, daß die durch Aldosteron bewirkte

Natriumretention zeitlich mit einem vermehrten Einbau von ^{14}C -Orotat in mikrosomale RNS zusammenfällt. Nach Ansicht von Dies und Lotspeich (1967) hat die NADPH_2 -Cytochrom_c-Reduktase eine wichtige Funktion für die tubuläre Rückgewinnung von Natriumionen. Mit Hilfe dieses Enzyms sollen durch Oxydation von NADPH_2 H^+ -Ionen entstehen, die tubulär sezerniert und gegen Na^+ ausgetauscht werden können.

Die vorliegenden Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Triamteren, dessen Na^+ eliminierender und K^+ retinierender Effekt auch bei adrenaletomierten Tieren nachgewiesen werden kann (Herken und Senft 1961), zeigen, daß dieses Pharmakon, nach Gaben diuretisch wirksamer Dosen ebenso wie Aldosteron die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion des Tricarbonsäurecyklus beeinflußt. Die α -Ketoglutaratdehydrogenase liegt allerdings außerhalb des von Edelman und Mitarbeitern für die Wirkung des Aldosteron verantwortlich gemachten Teils des Tricarbonsäurecyklus. Gleiche Veränderungen wurden nach Injektion von Amilorid beobachtet, dessen Wirkungsweise dem des Triamterens sehr ähnelt (Bear, Jones, Spitzer und Russo, 1967). Auf Grund der vorliegenden Befunde kann zwar noch nicht entschieden werden, ob zwischen der Aktivitätsabnahme der α -Ketoglutaratdehydrogenase nach Gabe der beiden Diuretica und ihrer natriumeliminierenden Wirkung eine Verbindung besteht. Es ist jedoch interessant, daß die gleichen Veränderungen auch bei adrenaletomierten Tieren auftreten. Von Losert, Sitt, Senft und Zesch (1967) ist mitgeteilt worden, daß unter dem Einfluß von Triamteren und Amilorid auch die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase und NADH_2 -Cytochrom_c-Reduktase abnimmt. Dieser Effekt trat jedoch nicht bei adrenaletomierten Tieren auf und kann deshalb nicht mit der diuretischen Wirkung der Pharmaka in Verbindung gebracht werden. Diese Autoren konnten auch zeigen, daß die NADP -Isocitratdehydrogenase, deren Aktivität durch Aldosteron beeinflußt wird, nach Gabe von Triamteren und Amilorid nicht verändert wird. Das gleiche gilt für die mikrosomale NADPH_2 -Cytochrom_c-Reduktase.

Die α -Ketoglutaratdehydrogenase ist ein Enzym, das als Cofaktoren Thiaminpyrophosphat, NAD und Coenzym-A benötigt. Bei der oxyda-

tiven Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Pyruvatdehydrogenase werden die gleichen Cofaktoren benötigt. Da nach Gabe von Triamteren und Amilorid die Pyruvatkonzentration in der Niere ansteigt (Losert, Sitt, Senft und Zesch, 1967), ist es möglich, daß die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase ebenfalls unter dem Einfluß der beiden Diuretica abnimmt. Die Ernie-
drigung der α -Ketoglutaratdehydrogenase-Aktivität nach Injektion von Amilorid beruht höchstwahrscheinlich auf einer Enzymhemmung. An einer aus Nierenmitochondrien hergestellten Enzympräparation dieses Fermentes wurde beobachtet, daß ein Zusatz von Amilorid die Umsatzgeschwindigkeit herabsetzt. Der Hemmtyp erwies sich gegenüber NAD, Coenzym-A und α -Ketoglutarat als nicht kompetitiv. Für eine 50 %ige Hemmung wurde eine Konzentration von $9 \cdot 10^{-5}$ M benötigt. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der Amiloridgehalt der Niere, der eine Stunde nach i.v. Injektion von 2 mg/kg des Diureticums im Gewebswasser des Organs gemessen wurde (Losert, Sitt, Senft und Zesch, 1967; Sitt und Losert, 1968).

Zusammenfassung

An der Rattenniere wurde untersucht, ob Aldosteron, Triamteren und Amilorid die Aktivität mitochondrialer Enzyme des Tricarbonsäurecyklus sowie der mikrosomalen NADPH_2 -Cytochrom_c-Reduktase und der hyaloplasmatischen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase beeinflussen.

4 Tage nach Entfernung der Nebennieren war die Aktivität der mitochondrialen Citrat-Synthase, NADP -Isocitratdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und NADH_2 -Cytochrom_c-Reduktase um durchschnittlich 20 % erniedrigt.

Wurden die adrenaletomierten Tiere mit Aldosteron in einer Dosis substituiert, die nach den Angaben von Cade und Perenich (1965) der physiologischen Inkretionsrate entspricht (10 $\mu\text{g/kg}$ d-Aldosteron, i.p., 180 und 90 Minuten vor Entnahme der Niere), so wurde ein ebenso großer Aktivitätsanstieg der Citrat-Synthase und der Isocitratdehydrogenase gemessen; die Umsatzgeschwindigkeit der Succinatdehydrogenase und der NADH_2 -Cytochrom_c-Reduktase nahm dagegen nach Gabe des Hormons nicht zu. Dieser Befund ist mit einer von Edelman (1966a; b) sowie Fimognari, Porter und Edelman (1967) aufgestellten Theorie vereinbar, nach der Aldosteron die Synthese von Enzymproteinen des Tricarbonsäurecyklus innerhalb des Stoffwechselweges zwischen Acetyl-CoA und α -Ketoglutarat induziert.

Entgegen der Annahme dieser Autoren ist jedoch die Wirkung des Hormons nicht auf mitochondriale Enzyme beschränkt. Auch die Aktivität der bei adrenaletomierten Ratten erniedrigten mikrosomalen NADPH_2 -Cytochrom_c-Reduktase steigt nach Gabe von Aldosteron an. Allerdings wird der bei Tieren mit Nebennieren gemessene Wert nicht erreicht.

Die Aktivität der im Hyaloplasma lokalisierten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase steigt nach Entfernung der Nebennieren an. Eine Behandlung mit Aldosteron hatte hierauf keinen Einfluß.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde geprüft, ob nach Gabe diuretisch wirksamer Dosen von Triamteren und Amilorid eine ähnliche Beeinflussung des Stoffwechsel auftritt, wie sie unter dem Einfluß von Aldosteron beobachtet wurde. Die renalen Wirkungen dieser Substanzen verhalten sich ähnlich wie ein Aldosteron-

mangel, ohne daß dafür die Anwesenheit der Nebennieren erforderlich ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit den Befunden von Losert, Sitt, Senft und Zesch (1967), daß die Aktivität der durch Aldosteron beeinflussten Enzyme nach Gabe von Amilorid (2 mg/kg i.v., 1 Std.) und Triamteren (10 mg/kg i.p., 1 Std.) nicht verändert wird. Dagegen nahm die Umsatzgeschwindigkeit der α -Ketoglutaratdehydrogenase unter dem Einfluß der beiden Pharmaka bei Ratten mit Nebennieren und adrenalectomierten Tieren ab. Dieses Enzym ist ebenfalls im Tricarbonsäurecyklus lokalisiert, liegt jedoch außerhalb des von Edelman und Mitarbeitern für die Wirkung von Aldosteron verantwortlich gemachten Stoffwechselweges.

Die beobachteten Veränderungen treten zwar zum gleichen Zeitpunkt auf wie die renale Wirkung von Aldosteron, Triamteren und Amilorid, der gegenwärtige Stand der Dinge erlaubt jedoch nicht zu entscheiden, ob und in welcher Weise die durch diese Substanzen beeinflussten Fermentaktivitäten mit dem tubulären Na^+ -Transport verknüpft sind.

Literatur

- Bartelheimer, H.K., W. Losert, G. Senft und R. Sitt
Hemmung der extrarenalen Wirkung von d-Aldosteron durch
Aktinomycin D
Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. u. exp. Path.
258, 372 (1967)
- Bear, J.E.
Pharmacology of diuretics
In: Renal and Diuretic Symposium
Rotterdam, Netherlands, October, 15, 1966 (in press)
- Bear, J.E., C.B. Jones, S.A. Spitzer, and H.F. Russo
The potassium-sparing and natriuretic activity of N-amidino-
3,5-diamino-6-chloropyrazinecarboxamide hydrochloride dihy-
drate (Amiloride Hydrochloride)
J. Pharmacol. exp. Ther. 157, 472 (1967)
- Bonner, W.D.
Succinic Dehydrogenase
In: Methods in Enzymology, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan
Vol. 1, p. 722; New York: Acad. Press 1955
Nach E.C. Slater and W.D. Bonner, Biochem. J. 52, 185 (1952)
- Bücher, Th., W. Luh und D. Pette
Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridin-
nucleotiden
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch-
pathologisch-chemischen Analyse
Teil A, S. 303; Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1964
- Cade, R., and T. Perenich
Secretion of aldosterone by rats
Amer. J. Physiol. 208, 1026 (1965)
- Castles, Th.R., and H.E. Williamson
Mediation of Induced Anti-Natriuresis via RNA-Synthesis
de novo
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 124, 717 - 719 (1967)
- Crabbé, J.
The Sodium-Retaining Action of Aldosterone
Edition Arscia, Presse Acad., Eur., Brussels 1963
- Dies, F., and W.D. Lotspeich
Hexose monophosphat shunt in the rat kidney during acid-base
and electrolyte imbalance
Amer. J. Physiol. 212, 61 (1967)
- Dulce, H.-J. und Th. Günther
Steuerung des cellulären Elektrolyt- und Wassergehaltes durch
Hormone
Naunym-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 238, 368
(1960)

Edelman, J.S.

Action of aldosterone on sodium transport
Abstract: International congress of nephrology,
September 25 - 30, 1966 (b), Washington, D.C., p. 67

Edelman, J.S.

Molecular process in steroid regulation of sodium transport
In: Second international congress on hormonal steroid
Milan, Italy, May, 23-28-1966
p. 43. Excerpta Medica Foundation,
Amsterdam, New York, London, Milan, Tokyo, Buenos Aires,
1966 (a)

Edelman, J.S., R. Bogoroch, and G.A. Porter

On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport
The role of protein synthesis
Proc. nat. Acad. Sci. U.S. 50, 1169 (1963)

Fanestil, D.D., and J.S. Edelman

Unveröffentlichte Untersuchungen (1965), zitiert nach Edelman,
J.S.: Subcellular distribution and mode of action of
aldosterone
In: Steroid Dynamics, edited by G. Pincus, Tnaka, and
J.F. Tait, Academic Press, New York - London, 1966

Fanestil, D.D., and J.S. Edelman

On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport
Effects of inhibitors of RNA and of protein synthesis
Feder. Proc. 25, 912 (1966)

Fimognari, G.M., G.A. Porter, and J.S. Edelman

The role of Tricarboxylic acid cycle in the action of
aldosterone on sodium transport
Biochim. Biophys. Acta 135, 89 (1967)

Goebel, H., and D. Pette

Die intracelluläre Verteilung von DPN- und TPN-spezifischer
Isocitratdehydrogenase
Enzymol. biol. clin. 8, 161 (1967)

Green, D.E., and D.M. Ziegler

Electron Transport Particles
In: Methods in Enzymology, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan
Vol. 6, p. 416; New York: Acad. Press 1963

Herken, H.

Unveröffentlichte Untersuchungen (1968)
Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin

- Herken, H. und G. Senft
2-, 4-, 7-Triamino-6-phenylpteridin als "Aldosteronantagonist"
Klin. Wschr. 39, 1205 (1961)
- Hohenwallner, W.
Der Einfluß von Korticoiden auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Erythrocyten
Clin. Chim. Acta. 16, 353 - 364 (1967)
- Horbers, W., and W. Muller
On the inhibition of RNA synthesis by actinomycin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 107 - 110 (1962)
- Kaplan, N.D., M.N. Swartz, M.E. Frech, and M.M. Ciotti
Phosphorylative and Nonphosphorylative Pathways of Electron Transfer in Rat Liver Mitochondria
Proc. Nat. Acad. Sci. 42, 481 (1956)
- Kaufman, S.
 α -Ketoglutaric Dehydrogenase System and Phosphorylating Enzym from Heart Muscle
In: Methods in Enzymology, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan Vol. 1, p. 714; New York: Acad. Press 1955
- Klingenberg, M., and D. Pette
Proportions of mitochondrial enzymes and pyridine nucleotids
Biochem. Biophys. Res. Comm., 7, 430 (1962)
- Liddle, G.W.
Specific and non specific inhibition of mineralocorticoid activity
Clin. exp. Metabol. 10, 1021 (1961)
- Löhr, G.W. und H.D. Waller
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment)
In: H.U. Bergmeyer: Methode der enzymatischen Analyse
Weinheim: Verlag Chemie 1962
- Losert, W., C. Senft und G. Senft
Extrarenale Wirkung des Aldosterons und der Spirolactone
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 248, 450 (1964)
- Losert, W., R. Sitt, G. Senft und A. Zesch
Biochemical studies on mechanism of action of compounds influencing tubular Na^+ transport: I. Aldosterone, amipramidine, triamterene
5. Symposium der Gesellschaft für Nephrologie
Lausanne, 21. - 23. September 1967
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall
Protein measurement with the Folin reagent
J. biol. Chem. 193, 265 (1951)
- Masters, B.S.S., and H. Kamin
Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome reductase
J. biol. Chem. 237, 921 (1965)

Ochoa, S.

Biosynthesis of tricarboxylic acid by Carbone Dioxide fixation
III. Enzymatic Mechanism (1948); zitiert bei A. Kornberg:
Isocitric-Dehydrogenase of Yeast (TPN)
In: Methods in Enzymology, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan
Vol. 1, p. 705; New York: Academ. Press 1955

Olsen, J.A., and C.B. Anfinsen

J. biol. Chem. 197, 67 (1952)
zitiert bei Karl-Heinz Bässler: Glutaminsäuredehydrogenase
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch-
pathologisch-chemischen Analyse
Teil A (Enzyme) S. 638; Berlin-Heidelberg-New York: Springer
1964

Pätau, K.

Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine
t-Tafel)
Biol. Zbl. 63, 154 (1943)

Pfeiffer, C.J., and P.J. Muller

The influence of Glucocorticoids on intestinal mucosal
Hexosemonophosphate shunt Enzymes in the rat
Arch. int. Pharmacodyn. 258, 166 (1967)

Phillips, A.H., and R.G. Langdon

Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase:
isolation, charakterisation, and kinetic studies
J. biol. Chem. 237, 2652 (1962)

Porter, G.A., R. Bogoroch, and J.S. Edelman

On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport:
The role of RNA synthesis
Proc. nat. Acad. Sci. U.S. 52, 1326 (1964)

Rabinowitz, M. and J.M. Fisher

A dissociative effect of puromycin on the pathway of protein
synthesis by Ehrlich ascitis tumor cells
J. biol. Chem. 237, 477 - 481 (1962)

Racker, E.

Biochim. Biophys. Acta 4, 211 (1950)
zitiert bei C.B. Anfinsen: Aconitase from Pig Heart Muscle
In: Methods in Enzymology, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan
Vol. 1, p. 695; New York: Academ. Press 1955

Sharp, G.W.G., C.H. Coggins, N.S. Lichtenstein, and A. Leaf

Evidence for a mucosal effect of aldosterone on sodium
transport in the toad bladder
J. clin. Invest. 45, 1640 (1966)

Sharp, G.W.G., and A. Leaf

Mode of hormone action: Studies on the mode of action of
aldosterone
In: Rec. Progr. Hormone Res. 22, 431 (1966), ed. by G. Pincus,
Academ. Press, New York and London, 1966

- Senft, G.
Über den Mechanismus und die Lokalisation der renalen Wirkung
von 2-, 4-, 7-Triamino-6-phenylpteridin
Naunym-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 243, 352
(1962)
- Sitt, R. und W. Losert
Unveröffentlichte Untersuchungen (1967)
Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin
- Sitt, R. und W. Losert
Unveröffentlichte Untersuchungen (1968)
Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin
- Stern, J.R., B. Shapiro, E.R. Stadtman, and S. Ochoa
J. biol. Chem. 193, 703 (1951)
zitiert bei Otto Wieland: Coenzym A-Enzyme
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch-
pathologisch-chemischen Analyse
Teil B (Enzyme) S. 84; Berlin-Heidelberg-New York: Springer
1966
- Wiederholt, M.
Mikropunktionsuntersuchungen am proximalen und distalen
Konvolut der Rattenniere über den Einfluß von Actinomycin D
auf den mineralocorticoid abhängigen Na-Transport
Pflügers Arch. ges. Physiol. 292, 334 (1966)
- Williams, Ch.H., and H. Kamin
Microsomal triphosphopyridine nucleotide-Cytochrome_c
reductase of liver
J. biol. Chem. 237, 587 (1962)
- Williamson, H.E.
Mechanism of the antinatriuretic action of aldosterone
Bioch. Pharmacol. 12, 1449 (1963)
- Yarmolinsky, M.B., and G.L. de la Haba
Inhibition by puromycin of aminoacid incorporation into
protein
Proc. nat. Acad. Sci. 45, 1721 - 1729 (1959)

Herrn Professor Dr. med. H. Herken danke ich für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin und für die Übernahme des Referates nach dem Tod von Herrn Professor Dr. med. G. Senft, von dem ich die Anregung für diese Arbeit erhielt.

An dieser Stelle möchte ich mich nochmals für sein stets förderndes Interesse bedanken.

Herrn Dr. med. W. Losert danke ich für viele klärende Diskussionen während der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 12. 8. 1940 wurde ich als Sohn des damaligen Assistenzarztes und heutigen Kurators der Freien Universität Dr. med. Friedrich von Bergmann und der damaligen Medizinalpraktikantin und heutigen Lungenfachärztin Christiane von Bergmann, geb. Hetzer, als drittes von fünf Kindern in Berlin geboren. Im Herbst 1946 wurde ich in Berlin-Wannsee eingeschult und im Frühjahr 1963 bestand ich mein Abitur an der Paulsen-Schule in Berlin-Steglitz.

Am 16. 4. 1963 wurde ich an der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert, bestand am 13. 3. 1964 meine naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 14. 10. 1965 meine ärztliche Vorprüfung.

Vom Januar 1965 bis Dezember 1967 arbeitete ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. Senft als Hilfskraft.

Am 30. 6. 1967 habe ich Fräulein cand. med. Jutta Stille geheiratet.

Am 28. 2. 1969 habe ich an der Freien Universität die ärztliche Prüfung bestanden.

Lebenslauf

Am 12. 8. 1900 wurde ich als Sohn des kaiserlichen Kreisphysikus
und künftigen Leiters der Freien Universität Dr. med. Wilhelm
von Reuter und der kaiserlichen Kreisphysikusin und künftigen
Leitung der kaiserlichen Kreisphysik Dr. med. Helene von Reuter
geboren. Von 1901 bis 1904 besuchte ich die Kaiserliche
Hochschule in Berlin. Im Herbst 1904 wurde
ich in Berlin-Mitte eingeschrieben und im Frühjahr 1905
ich zum Doktor an der Kaiserlichen Hochschule in Berlin
erhoben. Am 12. 8. 1905 wurde ich an der medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin immatrikuliert. Von 1905 bis 1906
war ich kaiserlich-königliche Vorlesung und am 12. 10. 1906 meine
ärztliche Promotion.
Von Sommer 1906 bis Dezember 1907 arbeitete ich in der Kaiserlichen
Hochschule in Berlin. Im Januar 1908 wurde ich unter der Leitung von
Prof. Dr. med. G. Mehl als Mitarbeiter.
Am 30. 8. 1908 habe ich meine erste med. Arbeit fertig
gestellt.
Am 28. 5. 1908 habe ich an der Freien Universität die ärztliche
Prüfung bestanden.

Druck:

DISSERTATIONSDRUCKSTELLE
der Ernst-Reuter-Gesellschaft
der Förderer und Freunde
der Freien Universität Berlin e. V.
Pächter: Franz Augustin
1 Berlin 33, Garystr. 45

